

2-ケト-L-グルン酸の製造法

特 願 昭 37-43475
出 願 日 昭 37.10.1
発 明 者 望月一男
宝塚市伊子志字円国寺159の5
同 神崎俊彦
宝塚市鹿塩字高丸1の35
同 岡崎尙良
吹田市山田下520
同 土居宗晴
同 所
同 奈良深
西宮市神垣町27
出 願 人 武田薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2の27
代 表 者 三木孝造
代 理 人 弁理士 松居祥二

発明の詳細な説明

本発明は2-ケト-L-グルン酸の製造法に関する。

2-ケト-L-グルン酸はビタミンCの合成中間体として有用なものであり、従来はたとえばL-ソルボーズを硫酸の存在下アセトンで処理してジアセトン・ソルボーズにし、これを酸化してジアセトン-2-ケト-L-グルン酸にする方法、5-ケト-グルコン酸を還元してイドン酸にし、これを微生物で酸化して2-ケト-L-グルン酸にする方法等が知られているがこれらはいずれも数工程を要し、操作が複雑となりまた収率の低下も免れず工業的には必ずしも有利な方法であるとはいえなかつた。

本発明者らはこのような事情に鑑み種々研究を行った結果、ソルボーズより1工程で2-ケト-L-グルン酸を生成する方法を見出し本発明を完成した。

すなわち本発明はシュードモナス・ブトレファシエンス、シュードモナス・ミルデンバージイに属する菌株をソルボーズ含有培地で培養するか、前記のごとき菌株の菌体処理物とソルボーズを接触させることを特徴とする2-ケト-L-グルン酸の製造法である。

本発明方法においてはシュードモナス・ブトレファシエンス、シュードモナス・ミルデンバージイに属する菌株またはこれらの菌株の菌体処理物が用いられる。

なお、また上記のごとき各菌類をたとえば紫外線、

X-線照射、ナイトロジエンマスタードなどの変異剤による処理等によつて2-ケト-L-グルン酸生成能のすぐれた変異株を人工的に造成し、かかる変異株ないしはその菌体処理物を使用してもよい。

これらの微生物は米国イリノイ州ベオリアの米国農務省北部利用研究所、同じくワシントン市の米国模範培養蒐集所、オランダ国バーンの微菌培養中央局、英国デインントンの国立産業細菌蒐集所、またはわが国においては東京大学応用微生物研究所、財団法人発酵研究所のような公共の菌種保存機関から常時入手することもできるし、また微生物学上現在用いられている手段でたとえば土壌、植物、空気、池水、井水、人尿、血液、膿等広く天然からこれらの菌を単離することもできる。

菌種の判定はおおむねバージェイズ・マニュアル・オブ・デターミナティブ・バクテリオロジイ(Bergeys Manual of Determinative Bacteriology)によつてなされるがその主要な性質は次の通りである。

- ・シュードモナス・ミルデンバージイ
- ・杆菌、0.3~0.5×1.0~3.5 μ、運動性極毛、グラム陰性
- ・ゼラチンコロニー：円形、裂片状、スムーズ、光沢あり
- ・ゼラチン穿刺：液化せず
- ・寒天斜面：スムーズ、拡布状、スライム状、光沢あり
- ・液体培養：混濁、緑黄蛍光色素、蛋白様スライム
- ・リトマスミルク：凝固せず、青色リング
- ・ポテト：スライム状、光沢あり、暗褐色
- ・グルコースを酸化して2-ケト-D-グルコン酸を作る。
- ・インドール：生成せず、硝酸塩：還元性なし、通性好気性、最適温度25℃
- ・シュードモナス・ブトレファシエンス
- ・杆菌、0.5~1.0×1.1~4.0 μ、運動性、単毛、グラム陰性
- ・ゼラチン穿刺：すみやかに袋状または層状に液化、混濁
- ・寒天斜面：粘性、やや赤味がかつた茶色
- ・液体培養：混濁、薄い灰色の菌膜、暗褐色沈殿
- ・リトマスミルク：すみやかに還元(脱色)、腐敗臭を伴い蛋白分解
- ・ポテト：スムーズ、光沢あり、粘性、茶褐色

・インドール：生成せず、硝酸塩：還元性あり、グルコースを酸化して2-ケト-L-グルコン酸を作る、アンモニアを生成、通性好気性、最適温度21℃、37℃で生育せず。

本発明方法において使用されうる菌株の選択は下記のごとき方法によつて行うこともできる。

すなわち、斜明培養より菌体を取り、適当な培地に接種する。培地組成の例としてはたとえば次のごときものでもよい。

1 ソルボーズ2%、グリセリン0.01%、ポリペプトン0.05%、コーンステープリカー1%、第一リン酸カリウム0.003%、第二リン酸カリウム0.007%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.001%、第一硫酸鉄(7水和物)0.001%、塩化ナトリウム0.005%。

2 ソルボーズ2%、酵母エキス0.5%。

菌を接種した培地を200rpmロータリーシーカーを用い28℃で培養し、一定時間ごとに培養液を採取し、アンバーライトIR-120(H型)で処理後水飽和フェノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行い公知の常法によつて発色を行うと2-ケト-L-グルコン酸はRf約0.2を示すのでこれによつて2-ケト-L-グルコン酸の生成が知られる。なお、定量はソモジー・ネルソン法によつた。

本発明方法においてはソルボーズを含有する培地に前記のごとき菌を培養してもよく、またソルボーズに前記のごとき菌の菌体処理物を作用させてもよい。

本発明においては、培養は一般に酸化発酵の様式によつて行うのが好ましい。培地は通常液体培地が使用されるがもちろん固型培地でもよい。培養の手段としては静置培養でも通気攪拌培養でもよい。

2-ケト-L-グルコン酸の生成に適当な栄養培地としては目的を達しうるかぎりなら特別の制限はなくたとえば菌が同化しうる炭素源、窒素源、その他無機塩類、微量の栄養素等を適当に含有しているのが望ましい。

これらの栄養源としては微生物の培養に際して一般に用いられる諸種の物質が適宜に適用される。すなわち窒素源としてはたとえばアンモニウム塩、硝酸塩類、コーンステープリカー、ペプトン、肉エキス、大豆粉、小麦粉、酵母エキス、酵母、尿素等の無機または有機の窒素含有物があげられ、炭素源としては原料であるソルボーズがそのまま使用されるがその他たとえば補助炭素源としてグリセリン、蔗糖、乳糖、麦芽糖、デキストリン、糖蜜等も使用される。無機塩類としてはたとえばカルシウム塩類、マグネシウム塩類、カリウム塩類、亜鉛塩類、銅塩類その他の金属塩類等が用いられる。その他さらに必要に応じて目的物質生成促進

因子等を添加してもよい。これらの各成分の配合割合、量等はいりる菌株の種類、ソルボーズの使用量、その他の条件等によつても異なり、個々の場合に応じて適宜に選択決定される。

培地中における原料ソルボーズの濃度は使用する菌株の種類等によつても異なるが、普通約1~200g/l程度が用いられ特に約5~50g/l程度が好ましい。

培養条件は、もちろん菌株の種類、培地の組成その他によつても異なり要するに目的物が最も効率よく生産されるように個々の場合に応じて選択すればよいことはいまでもないが、たとえば培養温度は約20~35℃、また培地のpH値は約3~9程度に維持するのがよい。培養時間は普通約20~200時間がよく、この程度の培養で目的物の生産が最高に達する。原料ソルボーズは培養開始時に培地に添加してもよく、また培養途上の適宜の時期に培地に添加してもよい。

なお、培養中培地のpH値を常に酵素活性に適した値に保持するため、場合によつては培養の進行にともなつて培地中に適宜の塩基性物質あるいは酸性物質を適当量添加混合してもよく、また培地中にあらかじめ適宜の緩衝剤を適当量添加混合しておいてもよい。

本発明の方法においては前記のごとき細菌の菌体処理物とソルボーズを接触させてもよい。菌体処理物としてはたとえば菌体または菌体摩砕物にアセトンを添加したいわゆるアセトンパウダー等の形態のものが好んで用いられるが、その他生菌の細胞体、凍結乾燥処理した菌の細胞体、それらの摩砕物等も同様に用いられる。なおこの場合の反応は前記の培養方法における同様の条件で行うこともできる。

また本発明者らの研究によると、本発明の方法において菌体処理物を用いる場合、その菌体の生産する酵素がソルボーズに接触して2-ケト-L-グルコン酸が生成されると考えられる。

かくして得られる反応生成物中から目的とする2-ケト-L-グルコン酸を、その性状を利用した適宜の手段で分離精製する。なお2-ケト-L-グルコン酸は遊離の酸として分離してもよく、たとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩として分離してもよい。

分離の方法としては目的を阻害しないかぎりいかなるものでもよいが、たとえば必要に応じて反応生成物から濾過、遠心分離あるいは活性炭処理等を行つて菌体を除去した後、この発酵生成物溶液をそのまま濃縮、再結晶等により目的物を取り出す方法、溶媒で抽出する方法、たとえばモレキュラーシーブ、イオン交換樹脂等の適宜の吸着剤と溶液とを接触させ目的物を吸着剤に吸着させついで適宜の溶媒で脱着して精製する方法等を単独で、あるいは適宜に組合わせ、あるいは反

適用することによつて行うこともできる。

なお2-ケト-L-グルン酸が遊離型で得られる場合はこれを適宜の方法によつたとえはナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム等の塩にしてもよく、また塩として得られた場合はこれを適宜の方法によつて遊離型あるいは他の塩に変えてもよい。

本発明における2-ケト-L-グルン酸の同定はたとえば元素分析、融点、赤外線吸収スペクトル、旋光度などの物理的性状によつても行いうる。

以上のごとく本発明方法によれば、ソルボーズより一工程で2-ケト-L-グルン酸を得ることができ、操作も簡単であり、収率も良好で工業的にきわめて有意義である。

実施例 1

下記の組成を有する培地10 mlを200 ml三角フラスコに分注滅菌し、シュードモナスブトレファシエンス(IFO 3910)の斜面培養を直接1白金耳接種し30℃で200 rpmのロータリー・シーカーにより7日間培養した。

培 地

ソルボーズ5%、ポリペプトン0.1%、イーストエキストラクト0.2%、第一リン酸カリウム0.1%、硫酸マグネシウム(7水和物)0.05%、(滅菌前のpH 7.5)

各培養時間ごとにサンプルを採取し、水飽和フェノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行い、2-ケト-L-グルン酸相当部より諸物質を抽出し、ソモジー・ネルソン法により定量を行い次の結果を得た。

培 養 日 数	3 日	5 日	7 日
2-ケト-L-グルン酸 γ /ml	10	150	350

実施例 2

下記の組成を有する培地30 lを50 lステンレス製培養タンクに調製し、120℃15分加圧殺菌したものに、シュードモナス・ミルデンバージイ(IFO 3487)の改良株をあらかじめ、2 l坂口コルベンに培地500 mlを分注し28℃レシプロカルシーカーで24時間培養したもの500 mlを接種し30℃、200 rpm、30 l/minの通気量で培養した。

タンク培地組成：

ソルボーズ5%、グリセリン0.1%、コーンステアブリカー0.5%、硝酸カリウム0.7%、塩化アンモニウム0.2%、第一リン酸カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.025% (滅菌前pH 7.5)

坂口コルベン用培地組成：

ソルボーズ2.0%、グリセリン0.1%、コーンステアブリカー1.0%、酵母エキス0.1%、ポリペプトン0.5%、第一リン酸カリウム0.03%、硫酸マグネシ

ウム0.01%、硫酸第一鉄0.01%、第二リン酸カリウム0.07%、(滅菌前pH 8.0)

培養の各時間に培養液を採取し、水飽和フェノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行い、2-ケト-L-グルン酸相当部より該物質を水で抽出しソモジー・ネルソン法により定量を行い次の結果を得た。

培 養 時 間	72時間	96時間	120時間
2-ケト-L-グルン酸 γ /ml	1560	2900	3080

ここで得られた培養液をハイフロッソパーセルを通して濾過し、濾液をアンバーライトIR-120(H型)にて処理したのちアンバーライトIR-45に通じて2-ケト-L-グルン酸を吸着せしめる。樹脂を1Nのアンモニア水で溶出し、溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加えて脱色処理後アンバーライトIR-200で処理してpH約1.5にし、水酸化カルシウムを加えてpH 6.0~6.5にした後濾過する。濾液を再びアンバーライトIR-200で処理してpH約1.5とし、アンバーライトIR-45に再び2-ケト-L-グルン酸を吸着せしめ0.1Nアンモニア水で溶出、溶出液をアンバーライトIR-120(H型)で脱アンモニア後減圧濃縮して2-ケト-L-グルン酸の結晶5.6 gを得た。

この方法で得られた結晶を水から再結晶したものとそのメチル誘導体の融点、赤外部吸収スペクトルなどの物理的性質はソルボーズから合成法によつて得られた標準2-ケト-L-グルン酸およびそのメチル誘導体のそれと一致した。

遊 離 酸

融 点：166℃

元素分析値：C₆H₁₀O₇・H₂Oとして

計 算 値 C：34.01%，H：5.7%

実 験 値 C：34.11%，H：5.82%

メチル誘導体

融 点：153℃

元素分析値：C₇H₁₂O₇として

計 算 値 C：40.28%，H：5.62%

実 験 値 C：40.30%，H：5.55%

実施例 3

シュードモナス・ミルデンバージイ(IFO 3487)を紫外線照射、単細胞分離を行い親株に比し相当量の2-ケト-L-グルン酸を蓄積する菌株を得ることができた。

下記組成の培地10 mlを200 ml三角フラスコに分注滅菌し、上記優良株を直接斜面より接種し30℃、200 rpmのロータリー・シーカーで培養した。

培 地

ソルボーズ5%、イーストエキストラクト0.5%、第二リン酸カリウム0.1%、硫酸マグネシウム(7水

(4)

特 公 昭41-160

和物) 0.05%、グリセリン 0.1%

培養経過は次の通りである。

培養時間	3日	4日	5日
2-ケト-L-グルン酸 (r/ml)			
親株	120	115	150
優良株	1550	2070	2650

定量は実施例1と同じ方法によつた。

実施例 4

実施例1の培地に下記の菌を培養し、培養液のペーパークロマトグラフィー(展開剤は水飽和フェノールを使用)によつて2-ケト-L-グルン酸の生成を認めた。

・ シュードモナス・ミルデンバージイ	I F O 3487
・ 同	I F O 3773
・ シュードモナス・ブトレフアシエンス	I F O 3910
・ 同	I F O 3909
・ 同	I F O 3908

特許請求の範囲

1 シュードモナス・ブトレフアシエンス、シュードモナス・ミルデンバージイに属する菌株をソルボーズ含有培地で培養するか、前記のごとき菌株の菌体処理物とソルボーズを接触させることを特徴とする。

BEST AVAILABLE COPY

